Enzymhistochemische Untersuchungen über den Nucleosid-, Phosphat- und Kohlenhydratstoffwechsel sowie biochemische Untersuchungen über den Tryptophanstoffwechsel während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin (DÄNA) durch dosierte orale Zufuhr des Cancerogens

Anton Feichtner

1971

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

em. Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

ENZYMHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN NUCLEOSID-, PHOSPHAT- UND KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL SOWIE BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN TRYPTOPHAN-STOFFWECHSEL WÄHREND DER CANCERISIERUNG DER RATTENLEBER MIT DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA) DURCH DOSIERTE ORALE ZUFUHR DES CANCEROGENS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anton Feichtner

aus Berchtesgaden

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Schauer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Büngeler
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	2o.Juli 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Uni-Druck, München 13

M E I N E R M U T T E R

G E W I D M E T

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	7
II.	MATERIAL UND METHODEN	9
III.	ERGEBNISSE	13
	1. Histologische Veränderungen bei den Nucleosid-5'-Triphosphatasen	13
	2. Histologische Veränderungen bei der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion	17
	3. Verhalten des Glykogens in den Ausfallsbezirken	19
	4. Untersuchungen, die eine toxische Ursache der Enzymausfallsbezirke ausschließen	20
	5. Biochemische Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase in Leberhomogenaten	21
IV.	DISKUSSION	24
V.	ZUSAMMENFASSUNG	30
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	31

I. EINLEITUNG

Die Entstehung von Tumoren von Anfang an zu verfolgen, war das Ziel vieler Forschungen, seit es gelingt, mit cancerogenen Stoffen experimentell Krebs zu erzeugen. Es braucht gewöhnlich einige Zeit, bis die Krebsgeschwulst mit Sicherheit diagnostizierbar wird. Bis zu diesem Zeitpunkt liegt die Schwierigkeit nun darin, transformierte Zellen, aus denen die Geschwulst entsteht, von normal gebliebenen Zellen zu unterscheiden.

In den letzten Jahren konnte man mit biochemischen, histochemischen und autoradiographischen Methoden tieferen Einblick in den Zellstoffwechsel des Kerns und des Zytoplasmas erhalten. Große Bedeutung ist dabei der Untersuchung verschiedener Enzymsysteme beizumessen. Dabei besteht die Möglichkeit, die Aktivität bestimmter Enzyme während des Cancerisierungsverlaufes in verschiedenen Phasen zu bestimmen. (KRÖGER und GREUER (35), WIELAND (70). Schon 1954 beschrieb GREENSTEIN (27) in vielen Tumoren Enzymdefekte im Vergleich zum Ausgangsgewebe. Insbesondere MORRIS und PITOT (44) beleuchteten die enzymatischen Unterschiede von experimentell erzeugten Lebertumoren bei Ratten im Vergleich zur normalen Leber. 1955 fanden WEBER und CANTERO (68), daß in den meisten experimentell erzeugten Lebercarcinomen der Ratte die Glucose-6-Phosphatase fehlt. SCHAUER, KRZENCIESSA und KUNZE (52), SCHAUER und KUNZE (53) berichten, daß nach Verabreichung von Diäthylnitrosamin an Sprague-Dawley-Ratten mit dem Trinkwasser bei einer Dosis von 4 mg/kg Körpergewicht/Tag mit großer Regelmäßigkeit um den 70. Versuchstag Enzymdefekte der Nucleosid-5-Triphosphatasen und der Glucose-6-Phosphatase in der Leber auftreten, lange bevor Lebertumoren beobachtet werden. Die Cancerisierung erfolgte bei diesen Versuchen über einen Zeitraum von 180 Tagen. Für Enzymverluste der Glucose-6-Phosphatase wurden gleiche Befunde auch von

W. GÖSSNER und H. FRIEDRICH-FREKSA (25), H. FRIEDRICH-FREKSA, G. PAPADOPULU und W. GÖSSNER (23), H. FRIEDRICH-FREKSA, W. GÖSSNER und P. BÖRNER (24) erhoben.

Diäthylnitrosamin (DÄNA) wurde aus verschiedenen Gründen als Cancerogen gewählt. Der Zeitablauf der Krebsentstehung erfolgt bei exakter Dosierung und einem einheitlichen Rattenstamm besonders regelmäßig (DRUCKREY und SCHMÄHL (19), M. F. RAJEWSKY et al. (49)). Nach 160 ± 20 Tagen sterben fast alle Versuchstiere an Carcinomen nach der Verabfolgung einer Gesamtdosis von 800 ± 100 mg Diäthylnitrosamin. Die große Wasserlöslichkeit des DÄNA bedingt offenbar die große Präzision des Wirkungsablaufes (MAGEE und LEE (42)).

Da trotz zahlreicher Kontrollen (histologische Untersuchungen auf Nekrosen und nekrobiotische Veränderungen, autoradiographische Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel, fortlaufende Untersuchungen von Serumfermenten) zytotoxische Wirkungen nicht mit voller Sicherheit auszuschließen waren, schien von großer Bedeutung, ob bei genau dosierter Zufuhr des Cancerogens mit der Schlundsonde in sehr geringer Dosierung in Absetzungsversuchen ähnliche Ergebnisse in bezug auf Enzymausfälle zu erwarten sind (57).

II. MATERIAL UND METHODEN

Es wurden zwei größere Untersuchungsreihen mit je 100 weiblichen Wistar-Ratten* angesetzt. Eine Reihe setzte sich aus fünf Gruppen von jeweils 20 Tieren zusammen. In der ersten Untersuchungsreihe betrug das Durchschnittsgewicht der verwendeten Ratten 150 Gramm (Alter etwa drei Monate). In der zweiten Reihe wogen die Tiere 200 Gramm (Alter etwa vier Monate). Diäthylnitrosamin wurde täglich in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht durch eine Schlundsonde in jeweils exakter Dosis verabreicht.

Berücksichtigung der Tagesperiodik: Tötung aller Versuchstiere einheitlich um 08.00 Uhr morgens, um Fehler zu vermeiden, die sich aus der 24-Stunden-Periodik verschiedener Leberfunktionen ergeben. Um 08.00 Uhr morgens soll z.B. der Glykogengehalt der Rattenleber nach HOLMGREN und BARGMANN (3, 31) das Tagesmaximum erreichen.

Schnittherstellung: Die Tiere werden durch Dekapitation in Äthernarkose getötet. Aus den großen Leberläppchen werden Gewebsstückchen von etwa 1 cm^3 entnommen und sofort durch ausströmende Kohlensäure eingefroren. Im Kryostat wurden bei -20°C Schnitte mit einer Schnittdicke von 7 μ hergestellt.

Die früheren Toxizitätskontrollen (SCHAUER, KRZENCIESSA und KUNZE (52)) und S. SCHAUER (55) wurden an Hand der Serumfermente (Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (GOT), Glutamat - Pyruvat - Transaminase (GPT) und Sorbitdehydrogenase) auch bei diesen Untersuchungen durchgeführt. Von den jeweils zu untersuchenden Tieren wurde nach Dekapitation das Blut aufgefangen und die Aktivität der Transaminasen photometrisch bestimmt.

---

* Die Tiere stammen aus der Staatlichen Versuchstieranstalt Hannover

Die Gruppe I der jeweiligen Untersuchungsreihe wurde nur einmal sondiert (Gesamtdosis (GD) 0,3 mg DÄNA).

Die Gruppe II erhielt an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 2 mg/kg Körpergewicht (GD 1,6 mg DÄNA).

Die Gruppe III wurde 30 Tage (GD 10 mg DÄNA),
die Gruppe IV 80 Tage (GD 26,6 mg DÄNA) und
die Gruppe V 100 Tage (GD 33,3 mg DÄNA)
sondiert.

Nachfolgende Tabelle soll die Methode nochmals verdeutlichen:

Tab. 1:

Sondierungsversuch mit DÄNA

Gruppen-Nr.	Einzeldosis	Gesamtdosis	Sondierungsdauer
Gruppe Nr. I		0,3 mg	1 Tag
Gruppe Nr. II	jeweils	1,6 mg	5 Tage
Gruppe Nr. III	2 mg/kg	10,0 mg	30 Tage
Gruppe Nr. IV	Körper-	26,6 mg	80 Tage
Gruppe Nr. V	gewicht	33,3 mg	100 Tage

Die ersten Untersuchungen erfolgten am 50. Tag nach Ansetzen der Tiere. Weitere Untersuchungen wurden am 60., 70., 80., 90., 100. und 120. Tag angeschlossen.

Der Enzymnachweis der Nucleosid-5-Triphosphatasen erfolgte nach der Methode von WACHSTEIN und MEISEL in der Modifikation nach SCHUBERT und RINNEBERG (65, 61).

Da die nucleären Reaktionen stark von der Technik abhängig sind, wurde versucht, in einem hohen Maße konstante Zeiten der Inkubation und Nachbehandlung der Schnitte einzuhalten, wobei bei den Nachbehandlungen mit der Stoppuhr gearbeitet wurde (36).

Als Substrate wurden verwendet:

Adenosin-5'-Triphosphat, Guanosin-5'-Triphosphat, Inosin-5'-Triphosphat, Uridin-5'-Triphosphat und Cytidin-5'-Triphosphat. Ferner wurde die Glucose-6-Phosphatase-Aktivität (WACHSTEIN und MEISEL (65)) geprüft. Die Substratmenge betrug bei den Triphosphatasen jeweils 10 mg, beim Nachweis der Glucose-6-Phosphatase 5 mg. Die Inkubationszeit betrug bei 47°C 45 Minuten.

Außerdem wurden Kryostatserienschnitte der Leber hergestellt (Dicke 10 μ) und der histochemische Nachweis von Glykogen durchgeführt. Der Nachweis erfolgte nach der Methode von NEUKIRCH (46).

Die frischen Kryostatschnitte wurden hierfür 30 Minuten in einer 10%igen, mit Glucose gesättigten Formollösung fixiert, mit Glucose gesättigtem Aqua dest. abgespült und nach BEST gefärbt.

Nach CHAN S. K., T. A. McCOY and D. E. KIZER (7) sind in den Geweben transplantierter Lebertumoren und dem Morris-Hepatom der Ratte (44) nur geringe Enzymkonzentrationen an Tryptophan-Pyrrolase vorhanden. Es wurde deshalb untersucht, ob ähnliche Ergebnisse auch für DÄNA-cancerisierte Ratten zutreffen. Es wurden 10 Kontrolltiere, 10 Tiere der Gruppe IV und 10 Tiere der Gruppe V untersucht. Den Ratten wurde intraperitoneal 5 Stunden vor dem Abtöten 2 g Tryptophan/kg Körpergewicht zur Induktion der adaptiven Bildung von Tryptophan-Pyrrolase injiziert. Die Lebern wurden mit der dreifachen Menge alkalischer 0,14 m KCL-Lösung (0,0025 m NaOH/l enthaltend) homogenisiert.

Die Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase erfolgte nach KNOX und AUERBACH (34): Phosphatpuffer wurde mit Tryptophanlösung und mit Rattenleberhomogenat vermischt und mit Wasser auf eine vorgegebene Menge ergänzt. Ein Leerwertansatz enthielt die gleichen Zusätze mit Ausnahme von Tryptophan. Nach Inkubation, während 60 min. bei 38 °C unter O_2 und ständigem Schütteln, gab man Metaphosphorsäure hinzu, ließ die Gefäße noch 5 min. schütteln, filtrierte, neutralisierte das Filtrat mit NaOH und bestimmte spektrophotometrisch die Absorption des gebildeten Kynurenins bei 365 mm in 1 cm-Cuvetten gegen Wasser als Blindwert. Die Extinktionsdifferenz zwischen Meßwert und Leerwert stellt das Maß für das gebildete Kynurenin dar. Die spezifische Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase wird durch die gebildete Menge des Kynurenins/g Lebergewicht angegeben.

III. ERGEBNISSE

1. Histologische Veränderungen bei den Nucleosid-5'-Triphosphatasen

Die Lebern der Tiere mit einer Gesamtdosis von 0,3 mg und 1,6 mg DÄNA, also aus Gruppe I (einmalige Zufuhr) und Gruppe II (fünfmalige Zufuhr), zeigten auch am 120. Tag nach Ansetzen keinerlei Veränderungen. Das enzymhistochemische Gewebsbild entspricht völlig dem von unbehandelten Ratten. In allen Abschnitten der Leberläppchen zeigt sich eine gleich hohe Enzymaktivität der Nucleosid-5'-Triphosphatasen.

Am Lebergewebe der Tiere der Gruppe III (30tägige Zufuhr, Gesamtdosis 10 mg DÄNA) können erste Enzymausfallsbezirke um den 70. Tag (40 Tage nach Absetzen des Cancerogens) festgestellt werden.

Zu diesem Zeitpunkt traten die Enzymdefekte allerdings nicht bei jedem Tier auf. Sie sind nur vereinzelt nachzuweisen und werden zunächst nur bei den Reaktionen mit Adenosin-5'-Triphosphat und Inosin-5'-Triphosphat als Substrate festgestellt. Am 120. Tag, also 90 Tage nach Absetzen des DÄNA, zeigen die Lebern der Tiere der Gruppe III die Ausfälle der untersuchten Nucleosid-5'-Triphosphatasen sehr eindrucksvoll und in großer Anzahl.

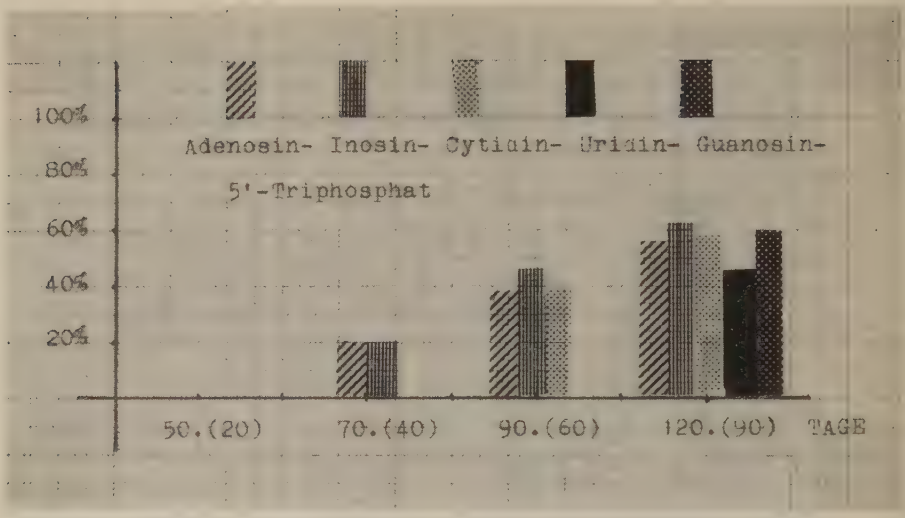


Abb. 1: Prozentualer Anteil von Enzymdefekten im Vergleich zum gesamten Lebergewebe nach 30tägiger Zufuhr, Gesamtdosis 10 mg DÄNA.
Abszisse: Zeit in Tagen, gerechnet nach Ansetzen des Cancerogens, in Klammern jeweils Zeit in Tagen, nach Absetzen des Cancerogens.

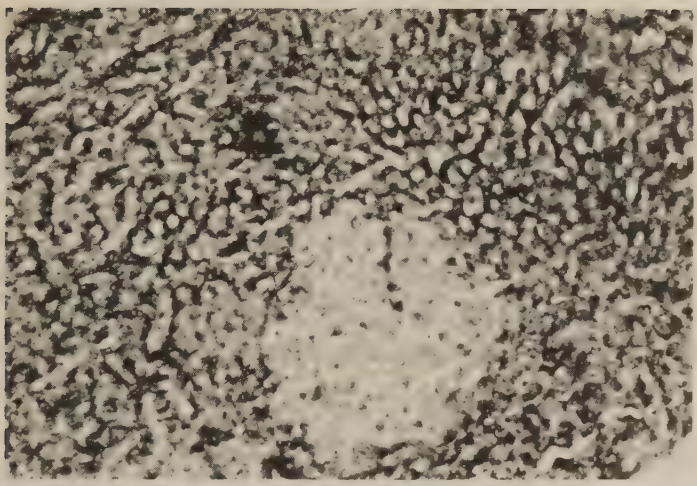


Abb. 2: Enzymausfallsbezirk der ATP-ase-Reaktion (Untersuchung erfolgte am 100. Tag, GD: 10 mg DÄNA) Vergrößerung: 120fach

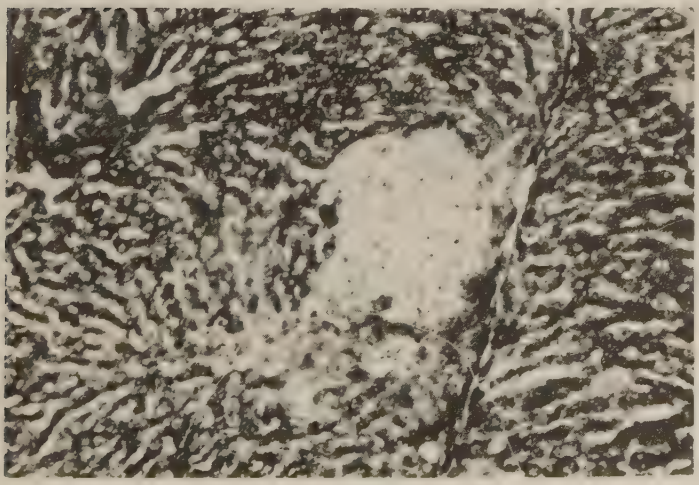


Abb. 3: Enzymausfallsbezirk der Guanosin-5'-Triphosphatase-Reaktion (Untersuchung erfolgte am 100. Tag, GD: 10 mg DÄNA) Vergrößerung: 120fach

Bei den Tieren der Gruppe IV (80 Tage, GD 26,6 mg DÄNA) und Gruppe V (100 Tage, GD 33,3 mg DÄNA) wurden wie bei den Tieren der Gruppe III am 70. Tag die ersten schwach ausgeprägten Enzymdefekte beobachtet. Dagegen wurden schon am 90. Tag, also 30 Tage früher als bei den Tieren aus Gruppe III, die Enzymdefekte der Nucleosid-5'-Triphosphatasen in großer Anzahl sichtbar. Nach Absetzen des Cancerogens am 80. Tag bei der Gruppe IV waren die Enzymdefekte ebenso wie in Gruppe III auch am 120. Tage vermehrt nachweisbar.

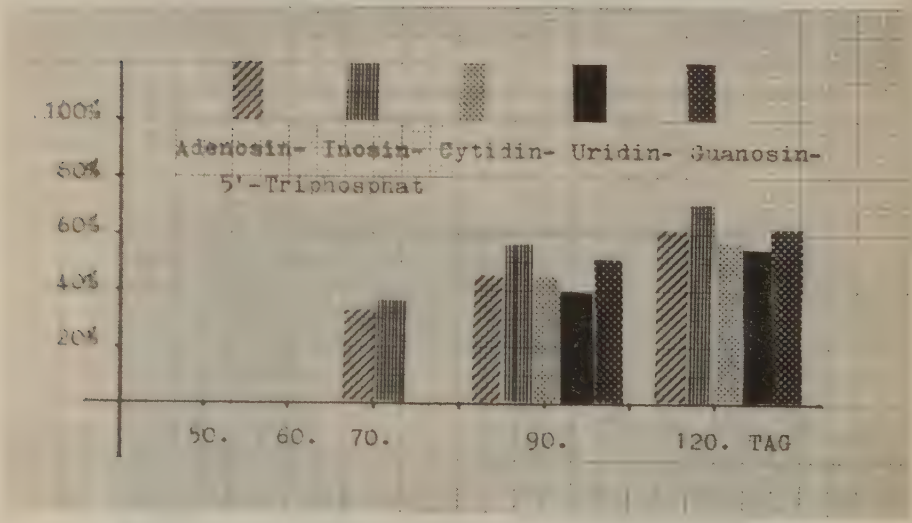


Abb. 4: Prozentualer Anteil von Enzymdefekten im Vergleich zum gesamten Lebergewebe nach 80tägiger Zufuhr, Gesamtdosis 26,6 mg DÄNA.

2. Histologische Veränderungen bei der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion

In der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion traten wider Erwarten keine den Defekten der Nucleosid-5'-Triphosphatasen entsprechende Enzymausfallbezirke auf, sondern es fand sich acinozentral häufig eine unscharf begrenzte Abschwächung der Enzymreaktion. Diese Tatsache wurde bei den Tieren aller Gruppen festgestellt. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, daß die Reaktionsniederschläge der Glucose-6-Phosphatase in der Läppchenperipherie wesentlich stärker hervortreten als bei den Kontrolltieren. (Die Schnitte der cancerisierten Tiere und der Kontrolltiere wurden jeweils auf einen Objektträger gebracht, um eine Verfälschung der Reaktionsniederschläge durch geringste Abweichung der Technik in Inkubation und Nachbehandlung auszuschließen).

Acinozentral finden sich um die Zentralvene Verluste der Reaktion, die nach den vorliegenden Befunden mit den Nucleosid-5'-Triphosphatasedefekten nicht identisch sind. Nach weiterer Behandlung mit DÄNA erreichen die Reaktionsverluste, die acinozentral ausgehen, die Läppchenperipherie und confluieren schließlich miteinander. "Durch die Verbindung der Glucose-6-Phosphatase-freien Bereiche wird die Leber schließlich in ein Netzwerk zerlegt, das anmutet wie ein Straßennetz" (23). FRIEDRICH-FREKSA weist auf die Tatsache hin, daß die Bildung von Straßen auch mit dem kaum cancerogenen Thioacetamid (TAA) eintritt. Es handle sich also nicht um Veränderungen, die notwendig mit der Cancerogenese in Zusammenhang stehen. Die Veränderungen sollen reversibel sein, wenn die Verabfolgung von Thioacetamid oder DÄNA abgebrochen wird und die Versuchstiere erst nach einigen Wochen untersucht werden. Die Leber lasse

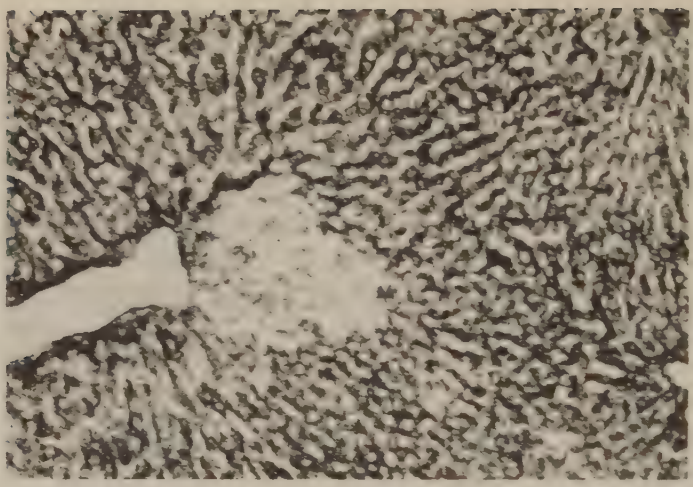


Abb. 5: Enzymausfallsbezirk der Inosin-5'-Triphosphatase-Reaktion (Untersuchung erfolgte am 100. Tag, GD: 26,6 mg DÄNA)
Vergrößerung: 120fach

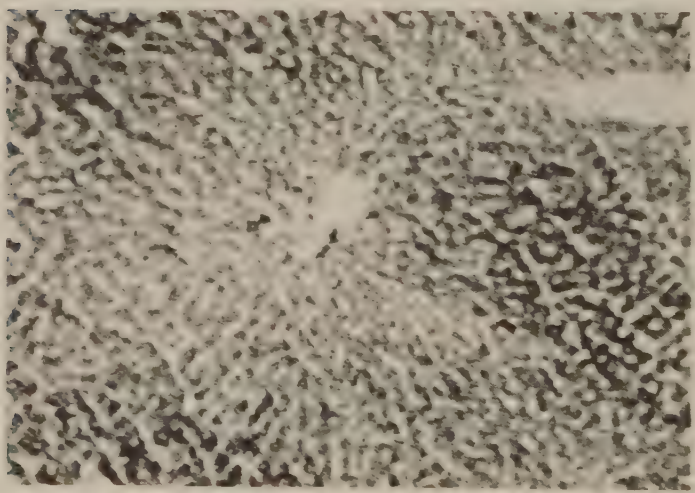


Abb. 6: Glucose-6-Phosphatase-Reaktion; acinozentral unscharf begrenzte Abschwächung der Enzymreaktion (Untersuchung erfolgte am 100. Tag, GD: 26,6 mg DÄNA)
Vergrößerung: 120fach

sich dann von einer normalen Leber nicht mehr unterscheiden. Entsprechende Veränderungen sind in der Literatur bereits bei der Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff und anderen Lebergiften beschrieben worden (RAPPAPORT (50)). Die Tatsache der Reversibilität bei Thioacetamid wurde von EDER, BUTENANDT und JOSTEN (20) erkannt. Ob daraus hervorgeht, daß es sich bei den Straßen um toxische Einwirkungen des DÄNA handelt, die nichts mit der Cancerogenese zu tun haben, müßte noch geklärt werden.

3. Verhalten des Glykogens in den Ausfallsbezirken

Um den 120. Tag traten bei den Tieren der Gruppe IV und V (40 bzw. 20 Tage nach Absetzen des Cancerogens) umschriebene Herde auf, deren Zellen eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kernes zeigen. Das Zytoplasma ist vakuolisiert. Ebenfalls wurde eine zytoplasmatische, meist grobschollige Glykogenspeicherung in solchen Zellgruppen beobachtet, deren Lage und Ausdehnung den Enzymausfallsbezirken entsprach. Der Gesamtgehalt an Glykogen in diesen Arealen war jedoch geringer als in der Umgebung. Dieses Bild entspricht der früheren, von KUNZE (36) gemachten Beobachtung der partiellen Glykogenspeicherung in älteren Ausfallsbezirken. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen GÖSSNER und BÖRNER (26). Sie berichten, daß in der Regel im Zytoplasma der Leberzellen, die ihre Glucose-6-Phosphatase Aktivität eingebüßt haben, Glykogen zu finden ist. Offenbar verliert die Leberzelle mit dem Einsetzen des Enzymschwundes die Fähigkeit, das Glykogen in physiologischer Weise abzubauen.

4. Untersuchungen, die eine toxische Ursache der Enzymausfallsbezirke ausschließen (Prüfung der charakteristischen Serumfermente):

Von den jeweils zu untersuchenden Tieren wurde durch Dekapitation Blut gewonnen und im Serum die Aktivität der Transaminasen (GOT und GPT) sowie die der Sorbitdehydrogenase photometrisch bestimmt.

Bei Schädigung von Organzellen, insbesondere toxischer Natur, erfolgt ein vermehrter Austritt ihrer Enzyme, der als Anstieg der speziellen Enzymaktivität im Blutserum mit empfindlichen Nachweismethoden bestimmt werden kann. Schon geringe, grobmorphologisch noch nicht sichtbare Zellschäden können beträchtliche Fermentaktivitätsanstiege im Serum verursachen. Zu beachten ist ferner, daß Angaben über Normalbereiche nicht einfach aus der Literatur übernommen, sondern im eigenen Laboratorium an einer möglichst großen Anzahl von Tieren überprüft werden müssen (MÜLLER-SEIFERT (45)). Diese an etwa 50 gesunden Tieren und 150 cancerisierten Tieren durchgeführten Bestimmungen ergaben eine der Norm entsprechende Aktivität der genannten Serumenzyme. Die auf eigene Erfahrung für das Blutserum der Ratte beruhenden Werte ergaben:

SGPT:	23 MilliE	±	7
SGOT:	59 MilliE	±	7
SDH :	2 MilliE	±	1

Diese Werte wurden während der gesamten Versuchsdauer nie überschritten. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von S. SCHAUER (55) beschriebenen Erkenntnissen. Erst bei Entwicklung größerer Tumoren ergab sich dort ein deutlicher Anstieg der Serumaktivitäten.

Tab. 2: Verhalten der für Leberschädigungen charakteristischen Serumfermente bei cancerisierten Ratten.
(Die Werte stammen vom 120. Tag nach Ansetzen des Cancerogens.)

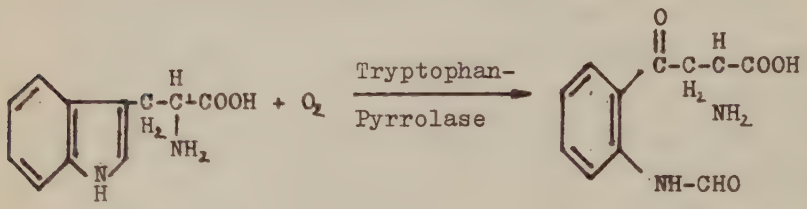
Enzym	Kontrollen	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	54 ME	57 ME	65 ME	56 ME	63 ME	53 ME
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	29 ME	18 ME	23 ME	24 ME	28 ME	21 ME
Sorbit-Dehydrogenase	2,1 MW	1,9 ME	2,5 ME	2,0 ME	1,8 ME	1,9 ME

5. Biochemische Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase in Leberhomogenaten:

Es konnte nachgewiesen werden, daß es bei Tumoren der Leber zu einem Verlust der Induktionsmöglichkeit bestimmter Enzyme kommen kann (PITOT, POTTER, MORRIS (48)). WIELAND (70) untersuchte die Tryptophanpyrrolase, KRÖGER und GREUER (35) das Verhalten der Tryptophan-Oxygenase bzw. der Tyrosin-2-Oxoglutarat-Transaminase nach Gabe des entsprechenden Substrates bzw. von Cortison. 1966 konnte SCHIEVELBEIN (58) nachweisen,

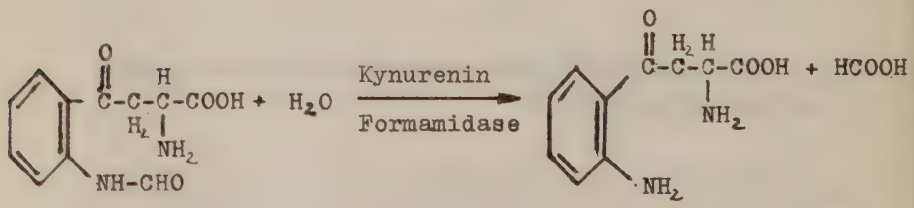
daß die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase aus der Rattenleber in vitro durch Zigarettenrauch gehemmt werden kann.

Die Tryptophan zu N'-Formylkynurenin aufspaltende Tryptophan-Pyrrolase kommt in Bakterien und unter anderem in der Rattenleber vor.



Tryptophan Sauerstoff N'-Formylkynurenin

Das durch die Tryptophan-Pyrrolase gebildete N'-Formylkynurenin wird durch die in Leberhomogenaten in starkem Überschuß vorhandene Kynurenin-Formidase in Kynurenin umgewandelt, dessen Konzentration spektrophotometrisch gemessen wird.



N'-Formyl-kyrunenin Wasser Kynurenin Ameisensäure

Die von uns gemessene Enzymaktivität der Tryptophan-Pyrrolase bei den cancerisierten Ratten und den Kontrolltieren lag um Werte von 1,200 ± 0,300 mg/g Lebergewicht. Zu einem Verlust der Induzierbarkeit der Tryptophan-Pyrrolase bei den cancerisierten Tieren kam es also nicht. (Die spezifische Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase wird durch die gebildete Menge des Kynurenins/g/Lebergewicht angegeben.) Die Streubreite von ± 0,300 mg lag deutlich über dem in der 2. Auflage von ENZYME Nomenclature, Recommendations of the International Union of Biochemistry (21) angegebenen Wert von ± 0,071 mg/g/Lebergewicht.

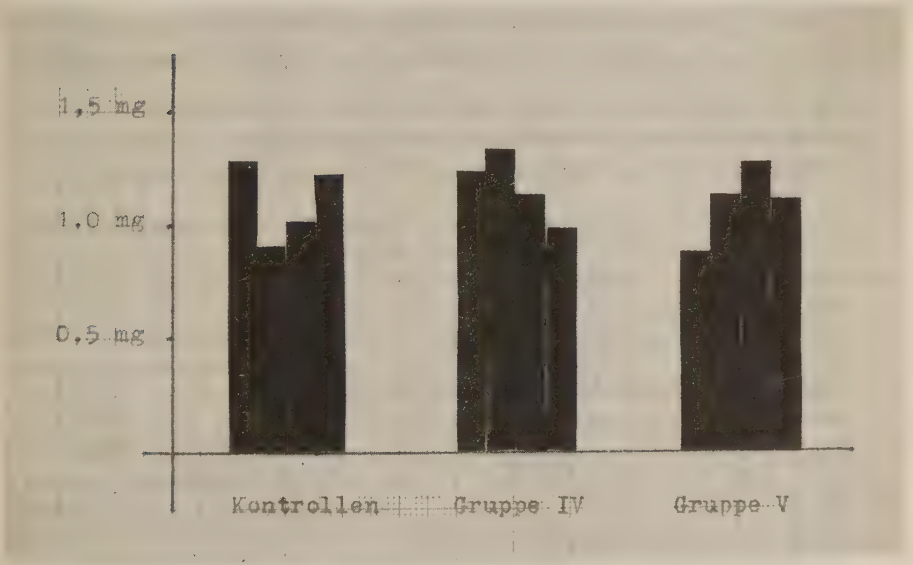


Abb. 7: Enzymaktivitäten der Tryptophanpyrrolase (Abszisse: Aktivität der Tryptophanpyrrolase pro Gramm Lebergewicht)

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

MAGEE und BARNES (38) entdeckten 1956 die cancerogene Wirkung des Dimethylnitrosamins an der Rattenleber. DRUCKREY und Mitarbeiter (10) konnten zeigen, daß diese Substanz in der Leber enzymatisch demethyliert wird. Dimethylnitrosamin wird über Monomethylnitrosamin zu Diazomethan unter Abspaltung von Formaldehyd abgebaut. Offenbar ist dabei Diazomethan, das alkylierende Agens, die eigentliche carcinogene Wirkform. Durch Gabe von ^{14}C markiertem Dimethylnitrosamin an Ratten haben dann MAGEE und FARBER (40) eine Methylierung in intakten Nucleinsäuren der Leber vor allem am N(7) des Guanins nachweisen können. Die Autoren nahmen an, daß eine Veränderung einer intakten Nucleinsäure notwendigerweise eine Veränderung der genetischen Information bedeutet. Seitdem konnte an über 70 N-Nitroso-Verbindungen (Dialkylnitrosaminen, Acylalkylnitrosaminen und Diazoalkanen) eine organotrope carcinogene Wirkung gefunden werden.

Bei der Untersuchung über das Verhalten nucleärer und nucleolärer Enzyme führte A. SCHAUER (51) 1963/64 Versuche auch an teilhepatektomierten Ratten während der Lebercancerisierung mit Diäthylnitrosamin durch. Dabei überraschten als Frühveränderungen während der Cancerisierung scharf begrenzte Enzymdefektbezirke der Nucleosid-5'-Phosphatasereaktionen, die im Bereich der Periportalfelder oder acinozentral neben der Zentralvene lokalisiert waren. Bei der Prüfung von histochemisch nachweisbaren Enzymen verschiedener intrazellulärer Lokalisation traten bei der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion ähnliche Bezirke mit Enzymverlusten bzw. starken Abschwächungen der Reaktion auf. 1964 erfolgte von GOESSNER und FRIEDRICH-FREKSA (25) eine Mitteilung über inselförmige Enzymausfälle der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion bei Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin und N-Nitrosomorpholin. In den letzten Jahren haben wir erkannt, daß

die Enzymdefektbereiche einen hohen RNS-Stoffwechsel aufweisen und längere Zeit Glykogen speichern. Die Identität der Bereiche wurde jeweils durch Untersuchungen an Serienschnitten gesichert (SCHAUER und KUNZE (53)).

Bei weiterer Zufuhr von DÄNA schwindet die durch Glykogenspeicherung bedingte starke Vacuolisierung des Zytoplasmas der Leberzellen. Auch die Schwellung der Zellen bildet sich zurück. Es findet sich nun ein verminderter Glykogengehalt dieser Zellen. Bei fortschreitender Cancerisierung nimmt die Zahl der Glykogen-negativen Zellen zu (36). FRIEDRICH FRENSA et al. (23) haben beobachtet, daß sich in diesen Arealen neue Zelltypen mit vermehrt basophilen Zytoplasma bilden, außerdem wechseln Zell- und Kerngröße. Mitosen sind häufiger, es kommt langsam zur Aufhebung der Läppchenstruktur.

Über die Speicherung von Glykogen während der Cancerisierung mit Nitrosaminen, N-Nitrosomorpholin und 2-Fluorenylacetamid wurde auch von BANNASCH (2) und GOERNER und BENOIT (26), FARBER und MAGEE (22), berichtet. Nach den gründlichen Untersuchungen von SCHAUER und KRZANOWSKA (52), SCHAUER und KUNZE (53) wurde es klar, daß sich im Bereich dieser Enzymdefekte später das histologisch erkennbare Mikrocarcinom und schließlich das ausgedehnte hepatocelluläre Carcinom entwickelt. Als Mikrocarcinom hat nach GRUNDMANN und SIEBURG (28) eine Ansammlung stark basophiler, aber noch gut differenzierbarer Leberparenchymzellen zu gelten.

Zur weiteren Abklärung der Bedeutung der Enzymdefektbezirke für die Cancerogenese waren Stoppversuche von besonderem Interesse, da dadurch zu klären ist, ob die Defekte auch nach Absetzen des Cancerogens auftreten und wenn sie bereits vorhanden sind, weiter bestehen bleiben. In der Tat ließ sich nach 30tägiger, gering dosierter Cancerogenzufuhr an Wistar-Ratten ein Auftreten von Enzymdefekten um den 70. Tag nachweisen (37). Während in den

70. Tag nur die Adenosin- und Inosin-5'-Triphosphatase ausfällt, zeigen die Uridin- und Guanosin-5'-Triphosphatase erst um den 100. Tag einen kräftigeren Substratumsatz. Diese Beobachtung würde mehr für eine Reaktion spezifischer ATP-ase als für ATP-spaltende Polyphosphatasen sprechen (s. NOVIKOFF und Mitarbeiter).

Ferner konnten nach Absetzen des Cancerogens am 80. Tag die Enzymdefekte auch am 120. Tag der genannten Cancerisierung noch nachgewiesen werden.

Diese beiden Befunde zeigen sehr eindrucksvoll, daß es sich bei den vorliegenden Befunden nicht um toxische, reparable Veränderungen handelt, sondern um irreversible, die mit größter Wahrscheinlichkeit auf sehr früh aufgetretene Veränderungen an DNS-Molekülen zurückgehen. Ähnliche Befunde konnten SCHAUER, VÖLLNAGEL und WILDANGER (56) 1969 bei der Auslösung von Darmtumoren mit Dimethylhydrazin (DMH) erheben. Hier genügte bereits die einmalige subcutane Zufuhr von 2 mg DMH, um multiple Darmtumoren auszulösen. Die Möglichkeit der Toxizität wurde wie bei SCHAUER und KRZENCIESSA (52) durch die Kontrolle der Serumfermente ausgeschlossen. THOMAS und SCHMÄHL (64) berichten: "Wir konnten bei Untersuchungen über morphologische Veränderungen durch Diäthylnitrosamin bei Gabe verschiedener Dosen keine Veränderung zeigen, die auf eine Cirrhose hindeuten". Diese Befunde werden ebenfalls durch frühere Versuche von SCHAUER und KUNZE (53) gestützt: Nach Absetzen des Cancerogens um den 107. Tag bleiben auch hier die Enzymdefekte bestehen. Es kommt zu einer weiteren Markierungszunahme nach Gabe von H^3-Cytidin. Zu einem Zeitpunkt also, bei dem durch das Lichtmikroskop keinerlei Veränderungen, weder am Kern noch im Zytoplasma, erkennbar sind, bilden die Enzymdefekte einen ersten Anhaltspunkt für die Entstehung einer Geschwulst.

Die selektive Erzeugung von Krebs in zahlreichen Organen beweist, daß die Dealkylierung nicht nur in der Leber

erfolgt (DRUCKREY und Mitarbeiter (10)). Angenommen wird als erster Schritt der Aktivierung eine 2-Hydroxylierung. In ihr muß die bemerkenswerte Organotropie begründet liegen, da der weitere Zerfall bis zur Bildung des alkylierend wirkenden Diazoalkans spontan erfolgt, also überall möglich ist (17). Die Organotropie ist also nicht der Wirkform, sondern dem ganzen Molekül des Nitrosamins zuzuordnen. Die im Sinne der Duplikantentheorie (16) angenommene irreversible Veränderung von Trägern genetischer Information als kausales Geschehen bei der Carcinogenese ist gerade am Beispiel von Nitrosaminen durch den Nachweis einer Alkylierung von DNS und RNS überzeugend gesichert worden. Es kann angenommen werden, daß die carcinogene Wirkung zu einem Verlust erblicher Informationen führt, also den Charakter von Defekten hat (36). Demgegenüber sagen WILHELM und LUDLMANN (69), daß eine Methylierung den Code nicht ändert, sondern vielmehr die Aktivität erheblich herabsetzt. Diese Untersuchungen würden aber nicht erklären, warum Enzymdefekte sich vergrößern und auf welche Weise einmal aufgetretene Enzymdefekte an die Tochterzelle weitergegeben werden.

Nachdem frühere Untersuchungen an Serienschnitten vor allem den Zusammenhängen zwischen den Enzymdefekten, dem Nucleinsäurestoffwechsel und dem Glykogenstoffwechsel gewidmet waren und die weitgehende Identität der Ausfallsbezirke der verschiedenen Enzyme angenommen wurde, zeigten die vorliegenden Untersuchungen, daß bei der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion vorwiegend acinozentral starke Enzymabschwächungen auftreten, während die Peripherie stärkere Aktivitäten aufweist als das Kontrollgewebe. Die Enzymdefekte der Nucleosid-5'-Triphosphatase-Reaktionen waren darüber hinaus wesentlich ausgeprägter als die der vorwiegend acinozentral gelegenen Abschwächungen der Glucose-6-Phosphatase-Reaktion.

Nach unseren jetzigen Befunden scheinen somit die multiplen Enzymdefekte der Nucleosid-Phosphatasen als praeneoplastische Veränderung bedeutungsvoll (SCHAUER und KUNZE (53)), während die in großer Anzahl auftretenden Glucose-6-Phosphatase-Verluste, die wesentlich diffuser erscheinen, nicht sicher in den Cancerisierungsprozeß einzubeziehen sind.

Es wird vermutet, daß den gefundenen Enzymdefekten eine ganze Reihe weiterer Enzymverluste zuzuordnen sind (36). Weiterhin schien es von Interesse, ob bei der Umwandlung der normalen Zelle zur Tumorzelle Enzymaktivitäten so verändert werden, daß der Vorgang biochemisch erfaßbar wird. KRÖGER und GREUER (35) und WIELAND (70) bestätigen diese Annahme. Sie konnten zeigen, daß während der Carcinogenese an der Leber es zu einem Verlust der Induzierbarkeit der Tryptophan-Oxygenase, der Tyrosin-2-Oxoglutarat-Transaminase, sowie der Tryptophanpyrrolase kommt. H. FÖRSTER und H. MEHNERT (62) berichten über den großen Tryptophanverbrauch und den damit verbundenen Proteinmangelerscheinungen im Tumorgewebe.

Daß unsere Versuche keine meßbaren Veränderungen der Induzierbarkeit der Tryptophanpyrrolase zeigten, liegt offenbar in der Tatsache begründet, daß nur in voll ausgebildeten Carcinomen ein Verlust der Induzierbarkeit nachzuweisen ist. Ferner sind für die Veränderungen im Tryptophanstoffwechsel mehrere Faktoren verantwortlich. So spielt im Ablauf der Reaktion das Vitamin B_6 eine wichtige Rolle. Es ist als Koenzym an der wichtigen Dekarboxylierung des 5-Hydroxytryptophans zu Serotonin beteiligt. Der Vitaminmangel führt zu einer Erniedrigung der Kynureninase und Kynurenintransaminase (62). Der Gesamtabbau scheint weite Schritte mit dem Weg zum Nikotinsäureamid zusammenzugehen. Der erste Angriff erfolgt am Indolring, der durch die Tryptophan-Pyrrolase - ein Eisen-Porphyrin-Enzym -

geöffnet wird. Es entsteht N-Formylkynurenin, das zu Kynurenin hydrolisiert wird (33). Das Hydroxykynurenin ist nicht als Zwischenprodukt der Vitamin B_6-Bildung, sondern der Ommochrom-Bildung durch BUTENANDT und Mitarbeiter entdeckt worden. Ommochrome sind Pigmente. Die Synthese der Ommochrome ist bei manchen Mutanten unterbrochen, es war eines der ersten Beispiele dafür, daß die Erbfaktoren bestimmte biochemische Reaktionen kontrollieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei diäthylnitrosamincancerisierten Wistar-Ratten treten bei ein- bzw. fünfmaliger täglicher oraler Applikation von Diäthylnitrosamin (2 mg/kg KG) bis zum 120. Tag keine praeneoplastischen Veränderungen auf.

2. Stoppversuche ergaben nach 30tägiger Zufuhr des Cancerogens in exakter Dosierung zwischen dem 70. und 120. Tag scharf begrenzte periportale bzw. neben der Zentralvene gelegene Enzymdefekte der Nucleosid-Triphosphatasen.

3. Die Glucose-6-Phosphatase-Reaktion zeigt keine den Defekten der Nucleosid-5'-Triphosphatasen entsprechenden Enzymausfallsbezirke, es erscheint nur acinozentral eine unscharf begrenzte Abschwächung der Enzymreaktion.

4. Entsprechend der Lage und Ausdehnung der Enzymausfallbezirke wurde eine zytoplasmatische, meist grobschollige Glykogenspeicherung beobachtet.

5. Ein Anstieg der für einen Leberzellschaden besonders toxischer Natur charakteristischen Serumfermente trat nicht auf.

6. Bei Tieren mit einer Gesamtdosis von 26,6 mg und 33,3 mg Diäthylnitrosamin kann von einem Verlust der Induzierbarkeit der Tryptophanpyrrolase nicht gesprochen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BANNASCH, P.: Nitrosamin-induzierte Glykogenese und Geschwulstbildung in der Rattenleber
Verh. der dtsch. Ges. f. Pathologie Göttingen (1967)

2. BANNASCH, P. und MÜLLER, H.A.: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus
Z. f. Arzneimittelforschung, 14, 805 (1964)

3. BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1959)

4. BAUER, K.H.: Das Krebsproblem
II. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer (1963)

5. BÖRNER, P.: Vergleichende Untersuchung des Verlustes von Glukose-6-Phosphatase und serologische Spezifität in Leberzellen der Ratte während der beginnenden Cancerogenese
Z. Naturforsch. 23 b, 1082 (1968)

6. BÜCHNER, F., GRUNDMANN, E. und OEHLERT, W.: Die experimentelle Cancerisierung der Parenchymzelle
Dtsch. med. Wschr. 86, 1845 (1961)

7. CHAN, S.K., McCOY, T.A. and KIZER, D.E.: Cancer Res. 20, 1303 (1960)

8. DONTENWILL, W., MOHR, W. und ZAGEL, M.: Über unterschiedlich lungencarcinogene Wirkung des Diäthylnitrosamins bei Hamster und Ratte
Z. Krebsforsch. 64, 499 (1962)

9. DONTENWILL, W.: Die organotrope Wirkung der Nitrosamine
Z. Krebsforsch. 65, 166 (1962)

10. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D. und MÜLLER, M.: Erzeugung von Magenkrebs durch Nitrosamine an Ratten Naturwissenschaften 48, 165 (1961)

11. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D. und MÜLLER, M.: Chemische Konstitution und carninogene Wirkung bei Nitrosaminen Naturwissenschaften 48, 134 (1961)

12. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D.: Erzeugung von Leberkrebs an Meerschweinchen Naturwissenschaften 49, 497 (1962)

13. DRUCKREY, H., SCHULDBACH, A., SCHMÄHL, D., PREUSSMANN, R. und INVANKOVIC, S.: Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin Arzneimittelforsch. 13, 841 (1963)

14. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., PREUSSMANN, R. und INVANKOVIC, S.: Krebserzeugung durch einmalige Dosis von Methylnitrosoharnstoff und verschiedenen Diäthylnitrosaminen Naturwissenschaften 50, 735 (1964)

15. DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S. und PREUSSMANN, R.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff Z. Krebsforsch. 66, 389 (1965)

16. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., MATZKIES, F. und IVANKOVIC, S.: Carcinogene Wirkung von 1,2-Diäthylhydrazin an Ratten Naturwissenschaften, 53, 557 (1966)

17. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S. und SCHMÄHL, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten Z. Krebsforsch. 69, 103 (1967)

18. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., MATZKIES, F. und INVANKOVIC, S.: Selektive Erzeugung von Darmkrebs an Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin Naturwissenschaften 44, 211 (1967)

19. DRUCKREY, H. und SCHMÄHL, D. (W.M. DISCHLER und A. SCHILDBACH): Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung Naturwissenschaften 49, 218 (1962)

20. EDER, M., BUTENANDT, O. und JOSTEN. R.: Morphologische, histochemische und autoradiographische Untersuchungen zur akuten und chronischen Thioacetamidvergiftung Frankf. Zschr. Path. 74, 599 (1965)

21. ENZYME NOMENCLATURE Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes (Comprehensive Biochemistry)

22. FARBER, E. und MAGEE, P.: Interaction between ethionine and rat liver ribonucleic acid and protein in vivo Cancer Research 27 Part. 1, 1761-1772, Oct. 1967

23. FRIEDRICH-FREKSA, H., PAPADOPULU, G. und GÖSSNER, W.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin Z. Krebsforsch. 72, 240-253 (1969)

24. FRIEDRICH-FREKSA, H., GÖSSNER, W. und BÖRNER, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin Z. Krebsforsch. 72, 226-239 (1969)

25. GÖSSNER, W. und FRIEDRICH-FREKSA, H.: Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Cancerisierung durch Nitrosamine Z. Naturforsch. 19 b, 862 (1964)

26. GÖSSNER, W. und BENOIT, H.: Third International Congress of Histochemistry und Cotychemistry New York 1968

27. GREENSTEIN, J.P.: Biochemistry of cancer New York (Academic Press 1954)

28. GRUNDMANN, E. und SIEBURG, H.: Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild Beitr. path. Anat. 126, 57 (1962)

29. GRUNDMANN, E.: Die Krebsentwicklung als intrazelluläres Problem, dargestellt am DÄNA - Krebs der Rattenleber Aus Mitteilungsdienst GBK 2, 589-633 (1962)

30. HOBIK, H.P. und GRUNDMANN, E.: Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin Beitr. path. Anat., Bd. 127, Heft 1, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1962)

31. HOLMGREN, H.: Studien über 24-stundenrhythmische Variationen des Darm-Lungen- und Leberfetts Acta med. scand. Suppl. 74, 202 (1936)

32. HOPPE-SYLER, THIERFELDER: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse 10. Auflage, VI Band/Teil B, S. 832

33. KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie Georg Thieme Verlag Stuttgart 1970

34. KNOX, W.E. and AUERBACH, V.H.: Journal of Biological Chemistry 214, 307, 1955

35. KRÖGER, H. und GREUER, B.: Einfluß des carcinogenen N-Nitrosomorphilin auf die Induzierbarkeit von Tryptophan-Oxygenase und Tyrosin-2-Oxoglutarat-Transaminase in der Rattenleber Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chemie 342, 148 (1965)

36. KUNZE, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin Dissertation, München 1967

37. MAGEE, P.N.: Toxic liver injury. The metabolism of Dimethylnitrosamine
Biochem. J. 64, 676 (1956)

38. MAGEE, P.N. and BARNES, J.M.: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine
Brit. J. Cancer 10, 114 (1956)

39. MAGEE, P.N. and VANDEKAR, M.: Toxic liver injury. The metabolism of dimethylnitrosamine in vitro
Biochem. J. 70, 606 (1958)

40. MAGEE, P.N. and FARBER, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo
Biochem. J. 83, 114 (1962)

41. MAGEE, P.N. and HULTIN, T.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of proteins of rat liver slices by dimethylnitrosamine in vitro
Biochem. J. 83, 114 (1962)

42. MAGEE, P.N., and LEE, K.X.: Alkylation of ribonucleic acid of rat liver by dimethylnitrosamine and n-butyl-methyl-nitrosamine in vivo
Biochem. J. 91, 35 (1964)

43. MOHR, U. und ALTHOFF, J.: Die diaplacentare Wirkung des Cancerogens Diaethylnitrosamin bei der Maus
Z. Krebsforsch. 67, 152 (1965)

44. MORRIS, N.R. and PITOT, H.C.: Some biochemical aspects of malignency
Ann. Rev. Biol. 35, 335 (1966)

45. MÜLLER-SEIFERT: Taschenbuch der Medizinisch-Klinischen Diagnostik
Verlag von J. F. Bergmann, 69. Auflage München 1966

46. NEUKIRCH, P.: Über eine Methode der Glykogenfixation
Zbl. Path. Bd. 20, H. 12

47. OEHLERT, W. und HARTJE, J.: Die Veränderungen des Eiweiß- und Ribonucleinsäurestoffwechsels der Leberepithelzelle während der experimentellen Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin Beitr. path. Anat. 128, 376 (1963)

48. PITOT, H.C., POTTER, V.R. and MORRIS, H.P.: Cancer Res. 21, 1001 (1961)

49. RAJEWSKY, M.F., DAUBER, W. and FRANKENBERG, H : Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. Science 152, 83 (1966)

50. RAPPAPORT, A.M., BOROWY, Z.J., LONGHEED, W.M. and LOTTO, W.N.: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit Anat. Rec. 119, 16 (1954)

51. SCHAUER, A.: Histochemische Untersuchungen über Nucleosid-5'-Triphosphat spaltende Kernenzyme an Mastocytomzellen und normalen Mastzellen Verhandl. d. deutsch. Gesellsch. f. Pathol., 47. Tag, 1963

52. SCHAUER, A., KRZENCIESSA, S. und KUNZE, E.: Histochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung mit Diaethylnitrosamin an der Rattenleber Verhandl. d. deutsch. Ges. f. Pathol., 50. Tagung Heidelberg 1966

53. SCHAUER, A. und KUNZE, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin Z. Krebsforsch. 70, 252 (1968)

54. SCHAUER, A.: Third International Congress of Histochemistry and Cytochemistry New York 1968

55. SCHAUER, S.: Enzymhistochemische und biochemische Untersuchungen an normaler Rattenleber und während der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin Dissertation München 1968

56. SCHAUER A., VÖLLMAGEL, T. und WILDANGER, M.: Cancerisierung des Rattendarmes durch 1,2-Dimethylhydrazin Z. Ges. exp. Med. 150, 87-93 (1969)

57. SCHAUER, A. und FEICHTNER, A.: Enzymhistochemische Untersuchungen über den Nucleosidphosphat- und Kohlenhydratstoffwechsel während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin durch dosierte orale Zufuhr des Cancerogens Klinische Wochenschrift 1286, Sept. 1968

58. SCHIEVELBEIN, H. und GRUMBACH, H.: Der Einfluß von Tabakrauchbestandteilen auf den Tryptophanstoffwechsel Zeitschrift für Krebsforschung, 70, 48-54 (1967)

59. SCHMÄHL, D. und PREUSSMANN, R.: Cancerogene Wirkung von Nitrosodimethylamin bei Ratten Naturwissenschaften 46, 175 (1959)

60. SCHMÄHL, D. und HAMPERL, H.: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten Naturwissenschaften 47, 89 (1960)

61. SCHUBERT, J.C.F. und RINNEBERG, H.: Der histochemische Nachweis von Adenosintriphosphat-spaltenden Enzymen bei pH 7,2 in menschlichen Knochenmarksausstrichen Blut VIII, 282 (1962)

62. SIEGENTHALER W.: Klinische Pathophysiologie Kohlenhydratstoffwechsel: H. FORSTER und H. MEHNERT Georg Thieme Verlag Stuttgart 1970

63. THOMAS, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte Z. Krebsforsch. 64, 224 (1961)

64. THOMAS, C. und SCHMÄHL, D.: Vergleichende morphologische und toxikologische Untersuchungen an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund zur Prüfung der cancerogenen Wirkung und Organotropie des Diäthylnitrosamins Virchows Arch. path. Anat. 340, 122 (1965)

65. WACHSTEIN. M. and MEISEL, E.: The histochemical distribution of 5-Nucleotidase and unspecific alkaline phosphatase in the testicle of various species and in two human seminomas J. histochem. Cytochem. 2, 137 (1954)

66. WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren Berlin, Springer-Verlag, 1926

67. WEBER, F. und WISS, O.: Am Tryptophanstoffwechsel beteiligte Enzyme. In: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse 10. Aufl., Bd. VI/B, S. 806 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966

68. WEBER, G. and CANTERO, H.: Glucose-6-phosphatase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues Cancer Res. 15, 105 (1955)

69. WILHELM und LUDLMANN (DRUCKREY): Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-Ratten Z. Krebsforsch. 69, 103 (1967)

70. WIELAND, O.: Zur Biochemie der Tumorzelle Molekularbiologie als Fundament der modernen Medizin Lehmann, München 1967

Herrn Professor Dr. A. Schauer danke ich besonders herzlich für die in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung und Förderung.

LEBENSLAUF

7. 2.1939: Als Sohn des Maurers Anton Feichtner und dessen Ehefrau Barbara Feichtner, geb. Kurz, in Berchtesgaden geboren.

1. 9.1945: Eintritt in die Volksschule in Berchtesgaden.

1. 9.1953: Nach achtjähriger Volksschulzeit Lehre bei der Bundespost.

1. 9.1958: Eintritt in das Abendgymnasium für Berufstätige in München.

15. 7.1962: Reifeprüfung am Abendgymnasium.

1.11.1962: Ein Semester an der Pädagogischen Hochschule in Pasing.

1. 5.1963: Zwei Semester Biologie an der Universität München.

1. 5.1964: Übertritt zur Medizinischen Fakultät.

1965: Naturwissenschaftliche Vorprüfung.

1966: Ärztliche Vorprüfung.

17.12.1969: Staatsexamen

1. 2.1970: Auf der chirurgischen und der geburtshilflich gynäkologischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Bad Aibling.

1. 1.1971: Auf der Medizinischen Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Oberföhring.